文章编号:1000-5404(2009)07-0585-04

论著

17β-雌二醇对氧糖剥夺神经元的保护作用

杨丽娟[1,2],邬力祥[1],李 伟[3],贺 芳[1],张 琰[1],黄柏胜[1] ([1]中南大学湘雅医学院生理学系,长沙 410078;滨州医学院:[2]生理教研室,[3]附属医院胸心外科,山东 滨州 256603)

摘 要:目的 研究17β-雌二醇(17β-estradiol,E_2)对氧糖剥夺大鼠皮层神经元的保护作用。**方法** 体外培养鼠脑皮层神经元,建立缺血缺氧模型。利用MTT代谢法、流式细胞术和Hoechst 33342荧光染色观察E_2(10^{-8}mol/L)对缺氧损伤皮层神经元细胞活力和凋亡的影响;硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)含量,黄嘌呤氧化酶法测超氧化物歧化酶(SOD)活力变化。**结果** 氧糖剥夺后神经元细胞活力显著降低,凋亡率升高,MDA生成增多,SOD的活力下降,与空白对照组相比有统计学差异($P<0.05$);E_2预处理后细胞活力升高、凋亡率下降、MDA生成减少、SOD的活性升高,与氧糖剥夺组相比有统计学差异($P<0.01$)。**结论** E_2对氧糖剥夺神经元具有保护作用,其作用可能与SOD活性提高拮抗氧自由基对细胞的损伤有关。

关键词: 17β-雌二醇;神经元;氧;葡萄糖;自由基
中图法分类号: R322.81; R329.28; R977.1 **文献标识码:** A

17β-estradiol pretreatment protects rat cortical neurons injured by oxygen-glucose deprivation *in vitro*

YANG Li-juan[1,2], WU Li-xiang[1], LI Wei[3], HE Fang[1], ZHANG Yan[1], HUANG Bo-sheng[1] ([1]Department of Physiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078; [2]Department of Physiology, Affiliated Hospital, [3]Department of Cardiotharasis Surgery, Binzhou Medical College, Binzhou 256603, Shandong Province, China)

Abstract: Objective To explore the effect of 17β-estradiol on rat cortical neurons injured by oxygen-glucose deprivation (OGD). **Methods** Primary cortical neurons were isolated from neonatal rats and identified with NSE staining, then cultured for 10 d under normal condition. To establish OGD injury, the culture medium was replaced by glucose-free medium, and cells were transferred to a humidified incubation chamber flushed by a gas mixture of 95% N_2 and 5% CO_2 at 37 ℃ for 2 h. To explore the influence of 17β-estradiol on neurons under OGD for 2 h condition, the cells were pretreated with 10^{-8}mol/L 17β-estradiol 24 h prior to OGD. The cell viability were evaluated by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, and the percentage of apoptotic cells was tested by flow cytometry and Hoechst 33342 staining. The contents of MDA and the activities of SOD were evaluated by biochemical methods. **Results** The results showed that OGD injury significantly decreased the cell viability and the activities of SOD, increased the percentage of apoptotic cells and the content of MDA ($P<0.05$). Pretreament of 10^{-8}mol/L 17β-estradiol increased the cell viability and the activities of SOD, decreased the contents of MDA and the percentage of apoptotic cells in cortical neurons exposure to OGD ($P<0.01$). **Conclusion** 17β-estradiol has the neuroprotective effect on cortical neurons after OGD injury. This effect of 17β-estradiol may be mediated by eliminating the free radicals by increasing the activities of antioxidative enzymes and thus inhibit the oxidative damages caused by OGD.

Key words: 17β-estradiol; neurons; oxygen; glucose; free radicals

流行病学调查发现,女性绝经以后缺血性脑卒中的发病率显著增加,而雌激素替代治疗可降低其发病率、死亡率,缩小梗死面积,减轻神经病学症状[1,2],说明雌激素具有神经保护作用。本研究通过体外培养皮层神经元建立氧糖剥夺模型,观察雌激素对氧糖剥夺损伤神经元的保护作用,为雌激素的临床应用和神经保护药物的开发提供参考依据。雌激素中17β-雌二

基金项目:教育部博士点基金(20050533062)
Supported by the Project for Doctoral Program of Ministry of Education of China (20050533062)
作者简介:杨丽娟,女,山东省郓城县人,博士研究生,讲师,主要从事神经保护方面的研究,发表论文5篇。电话:(0535)6913210,E-mail:yljlw@163.com
通信作者:邬力祥,电话:(0731)8836821, E-mail:ywlx@mail.csu.edu.cn
收稿日期:2008-07-29;修回日期:2008-09-27

醇(17β-estradiol,E_2)的生物学效应最强,因此本实验以 E_2为代表研究雌激素的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

出生 1 d 的 SD 大鼠(中南大学实验动物中心提供),多聚赖氨酸、DMSO、E_2(Sigma 公司),DMEM/F12 (Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青生物材料工程公司),胰蛋白酶、MTT(美国 Amresco 公司),超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)(南京建成生物工程研究所),神经元特异性烯醇化酶(NSE,美国 Santa Cruz 公司),倒置显微镜 IX270(Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠皮层神经元的培养 取新生 SD 大鼠消毒、断头,分离大脑皮层,剪碎,胰酶消化 15 min, 1 000 r/ min 离心 5 min,弃上清,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,吹打混匀,接种至预先以多聚赖氨酸包被的培养板或培养瓶中,37 ℃、5% CO_2培养箱中培养,每天在倒置显微镜下观察神经细胞的生长情况,培养第 3 天加入终浓度为 10 μmol/L 的阿糖胞苷作用 48 h,将培养 10 d 的细胞用于实验(实验前部分细胞用 ABC 法进行 NSE 染色鉴定神经元)。

1.2.2 氧糖剥夺模型 细胞培养液换为预先通以缺氧混合气 (95% N_2 + 5% CO_2) 30 min 的无糖培养液,然后将细胞立即置于 37 ℃ 的缺氧密闭室内继续通以缺氧混合气(流量为 1.8 ~ 2 L/min),以排除含氧的空气。30 min 后夹闭缺氧密闭室的进口和出口,37 ℃,饱和湿度条件下培养 2 h[3]。

1.2.3 实验分组 空白对照组:细胞换为无血清培养液;氧糖剥夺组:换为缺氧的无糖培养液,缺氧处理 2 h;E_2组:换为 E_2浓度为 10^{-8} mol/L 的无糖培养液,缺氧处理 2 h。

1.2.4 MTT 代谢活性检测 加入含 MTT(终浓度为 0.5 mg/ml)的培养液,在 37 ℃、5% CO_2饱和湿度条件下,孵育 4 h 后弃上清,加入 DMSO,20 min 后置酶标仪于 570 nm 处测定光密度值[D(570)]。对照组细胞活性为 100%,实验组按细胞活性公式计算。

细胞活性(%) = 实验组 D(570)均值/正常对照组 D(570)均值 × 100%

1.2.5 细胞凋亡检测 收集细胞,加入冰预冷的 70% 乙醇于 4 ℃固定 24 h。调整细胞数为 10^6 ml^{-1},取 1 ml 细胞悬液,用 PBS 洗 3 次。细胞重悬于含 RNaseA 的 PI 染液中,37 ℃孵育 30 min,以流式细胞仪检测细胞凋亡率。将处理后的细胞置于含 1 μg/ml Hoechst 33342 的 PBS 中,室温下染色 15 min, PBS 清洗,荧光显微镜下观察凋亡细胞显示的核浓染、核碎裂等典型的形态学改变。

1.2.6 SOD 活性和 MDA 含量检测 分别采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 含量,硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,按试剂盒说明书进行检测。

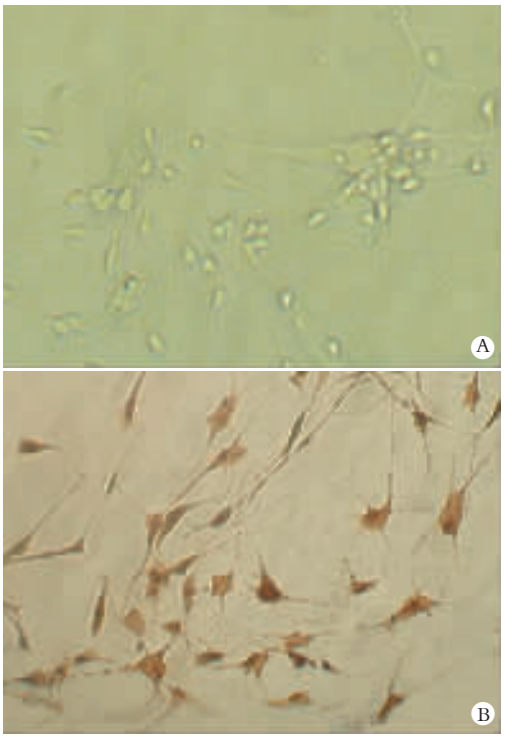
1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析。

2 结果

2.1 皮层神经元培养及鉴定

培养至第 10 天可见神经元形态饱满,突起多而粗大,细胞明显可辨,细胞体较大,呈圆形或椭圆形,折光性好,光晕强,细胞交织成密集的神经元网络(图 1A)。NSE 免疫细胞化学染色结果显示,阳性细胞质或突起呈棕褐色,细胞阳性率在 90% 以上(图 1B)。



A:倒置显微镜观察(×200);B:免疫组化染色(NSE ×400)

图 1 皮层神经元培养 10 d 鉴定结果

2.2 E_2对氧糖剥夺神经元细胞活力的影响

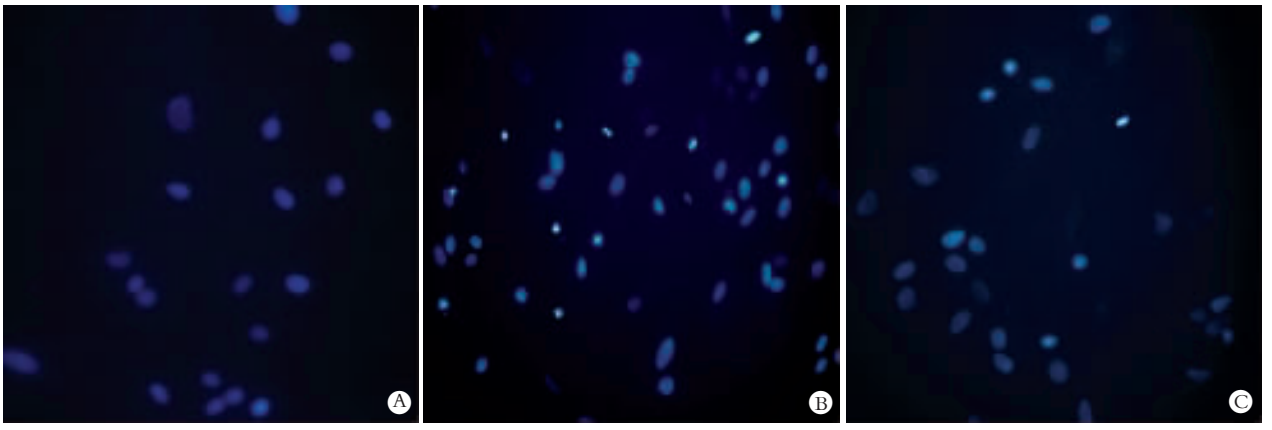
与空白对照组[(100.00 ± 10.30)%]相比,氧糖剥夺组细胞活力[(68.83 ± 7.08)%]显著降低(P < 0.05);而与氧糖剥夺组比较,10^{-8} mol/L 的 E_2[(87.44 ± 8.14)%]可明显提高细胞活力(P < 0.01)。

2.3 E_2对氧糖剥夺神经元凋亡率的影响

流式细胞术结果显示,与空白对照组[(5.25 ± 1.49)%]相比,氧糖剥夺组凋亡率[(27.31 ± 3.27)%]显著升高(P < 0.05),E_2组[(11.90 ± 2.59)%]与氧糖剥夺组相比,凋亡率明显降低(P < 0.01)。Honchest 33342 荧光染色显示,空白对照组细胞核染色均匀,细胞核大而规则;氧糖剥夺组细胞核可见较多致密的颗粒状荧光,表明细胞核已固缩碎裂,即有明显的细胞凋亡产生;雌二醇组与氧糖剥夺组相比,凋亡细胞明显减少,大多细胞核呈弥散均匀荧光即正常细胞核(图 2)。

2.4 E_2对皮层神经元 SOD 活性和 MDA 含量的影响

与空白对照组相比,氧糖剥夺组细胞 SOD 活性降低,MDA 含量增加,差异具有统计学意义(P < 0.05);与氧糖剥夺组相比,E_2处理组细胞 SOD 活性升高,MDA 含量明显降低(P < 0.01,表 1)。



A: 空白对照组;B:氧糖剥夺组;C: E_2 组

图 2　Hoechst 33342 荧光染色法检测细胞凋亡　(×200)

表 1　E_2 对缺氧损伤神经元 SOD 活性和 MDA 含量的影响

($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD(U/ml)	MDA(nmol/ml)
空白对照组	78.8 ± 10.4	2.6 ± 0.7
氧糖剥夺组	42.9 ± 11.8[a]	4.9 ± 0.8[a]
E_2组	64.3 ± 9.9[ab]	3.1 ± 0.9[b]

a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,与氧糖剥夺组比较

3　讨论

传统的神经元培养多采用胎鼠,但使用胎鼠必须严格控制胎龄,用量较大,且母鼠不能重复利用,成本较高。本实验中,我们采用出生 24 h 以内的 SD 鼠进行神经元培养,于培养 48 h 加入阿糖胞苷抑制非神经细胞生长,保证了神经元的纯度。培养的神经元经 NSE 免疫细胞化学染色证实纯度在 90% 以上,可用于实验。我们将培养的神经元孵育于无氧无糖环境中,以模拟体内缺血缺氧的状况。与对照组相比,氧糖剥夺 2 h 时,细胞活力明显降低,凋亡率升高,说明氧糖剥夺导致细胞损伤,缺血缺氧模型是成功的。

脑组织中含有高浓度不饱和脂肪酸、儿茶酚胺和高水平的氧代谢产物,是氧自由基最易攻击的器官。脑缺血时机体产生大量的氧自由基,使生物膜机构中的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,磷脂被降解,细胞膜结构变性,影响信号转导系统从而引起细胞的损伤、凋亡[4,5]。实验中我们观察到,氧糖剥夺后,SOD 活性为(42.9 ± 11.8) U/ml,与对照组相比明显降低,而 MDA 含量[(4.9 ± 0.8) nmol/ml]显著增高。SOD 是超氧阴离子的特异性清除剂,SOD 活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力,MDA 是脂质过氧化的代谢产物,反映生物膜脂质过氧化水平,SOD 活性降低和 MDA 含量的增加,说明氧糖剥夺抑制了 SOD 活性,机体清除自由基能力降低,抗氧化损伤能力降低。多项研究表明,SOD 活性降低致细胞抗氧化损伤能力降低是细胞凋亡、损伤的重要原因之一[6,7]。氧自由基除可影响信号传导进而影响基因表达外,还可直接损伤 DNA 诱导细胞凋亡,也可攻击蛋白质导致许多酶蛋白丧失活性,诱导细胞凋亡。本实验结果显示氧糖剥夺损伤神经元 SOD 活性降低,而细胞膜脂质过氧化增强,且细胞凋亡率增高,提示缺氧导致的脂质过氧化损伤可能是氧糖剥夺损伤神经元凋亡率升高的因素之一。

雌激素除作用于生殖系统外,在神经系统的作用也越来越受重视,成为近些年研究的热点。雌激素在神经系统的保护作用已成定论,其保护作用主要表现在提高体外培养缺血海马神经元存活率,降低兴奋性氨基酸释放等方面。雌激素保护作用机制复杂,涉及直接基因途径、信号转导机制、抗炎和抗氧化作用等。Kii 等[8]研究发现,雌激素可减少缺血侧超氧自由基,而对对侧无明显影响。Angoa-Perez 等[9,10]研究也证实雌激素可抵抗氧化应激导致的神经元死亡 。其抗氧化机制可能涉及以下 2 条途径:①直接途径。Green 等[11]发现,雌激素分子中甾体 A 环 C3 位的羟基通过结构活性的转化抑制了脂质过氧化,羟基的氢原子很容易传递给脂质超氧自由基,使沿着链式传递的氧化过程终止。因此雌激素的抗氧化作用部分来源于雌激素的直接抗氧化作用,这种作用比较迅速。②间接途径。雌激素作用于组织细胞,使其释放抗氧化活性物质如 SOD、过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶等,使氧自由基清除率增加,MDA 生成减少。以上研究都集中于在体动物模型,体外培养的相关报道较少。体外培养有助于排除其他细胞的干扰,便于研究某一因素对细胞的单独作用及其机制。本实验我们采用 E_2 作用于原代培养皮层神经元,观察雌激素对神经元氧糖剥夺损伤的影响及抗氧化机制。结果显示运用 E_2 能够有效抑制缺血缺氧所引起的神经元凋亡,提高细胞活力;SOD 活性明显升高,而 MDA 含量降低。以上结果表明,E_2 通过间接机制,即提高 SOD 活性抑制氧自由基对细胞的损伤,阻断自由基链式反应从而保护神经

元免受缺氧损伤,减少了神经元凋亡。然而,雌激素对离体神经元的缺氧保护作用是否涉及直接机制,以及到底通过哪些途径使SOD活性提高,都还没有实验证实。进一步研究雌激素的神经保护作用及其机制,将为其临床应用及新药开发提供广阔的前景。

(致谢:感谢滨州医学院杨成教授、张慧副教授、张丽霞老师等给予的无私帮助!)

参考文献:

[1] Murphy S J, McCullough L D, Smith J M. Stroke in the female: role of biological sex and estrogen[J]. ILAR J,2004,45(2):147-159.
[2] Niewada M, Kobayashi A, Sandercock P A, *et al*. Influence of gender on baseline features and clinical outcomes among 17,370 patients with confirmed ischaemic stroke in the international stroke trial[J]. Neuroepidemiology,2005,24(3):123-128.
[3] 周 烜,邬力祥,刘发益,等. 低氧预适应对离体星形胶质细胞缺氧/复氧耐受性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(8): 681-684.
[4] 向 强,杨 娟,文 亮,等. 内毒素预处理对大鼠前脑缺血再灌注后海马神经元保护效应的研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(19): 1762-1764.
[5] Liu L X, Chen W F, Xie J X, *et al*. Neuroprotective effects of genistein on dopaminergic neurons in the mice model of Parkinson's disease[J]. Neurosci Res, 2008, 60(2):156-161.
[6] Lu G, Shimizu I, Cui X, *et al*. Antioxidant and antiapoptotic activities of idoxifene and estradiol in hepatic fibrosis in rats[J]. Life Sci,2004, 74(7):897-907.
[7] Terui K, Enosawa S, Haga S, *et al*. Stat3 confers resistance against hypoxia/reoxygenation-induced oxidative injury in hepatocytes through upregulation of Mn-SOD[J]. J Hepatol, 2004, 41(6): 957-965.
[8] Kii N, Adachi N, Liu K, *et al*. Acute effects of 17beta-estradiol on oxidative stress in ischemic rat striatum[J]. J Neurosurg Anesthesiol, 2005, 17(1): 27-32.
[9] Angoa-Perez M, Jiang H, Rodriguez A I, *et al*. Estrogen counteracts ozone-induced oxidative stress and nigral neuronal death[J]. Neuroreport, 2006, 17(6): 629-633.
[10] Wallace D R, Dodson S, Nath A, *et al*. Estrogen attenuates gp120- and tat1-72-induced oxidative stress and prevents loss of dopamine transporter function[J]. Synapse, 2006, 59(1): 51-60.
[11] Green P S, Gordon K, Simpkins J W. Phenolic A ring requirement for the neuroprotective effects of steroids[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1997, 63(4-6): 229-235.

(编辑 张 维)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)07-0588-01

吉西他滨联合顺铂方案治疗局部晚期非小细胞肺癌近期疗效观察

王 言 (襄樊市中心医院肿瘤科,湖北 襄樊 441021)

近年来,肺癌的发病率和病死率呈逐步上升趋势[1],其中80%为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。大多数患者就诊时已丧失手术机会,化疗则在NSCLC的综合治疗中占据重要地位。2005年5月至2007年5月我科予GP[吉西他滨(GEM)+顺铂(DDP)]方案治疗局部晚期NSCLC 30例,观察其疗效和毒副反应,现总结报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例选择

晚期初治的NSCLC 30例,均经组织病理学或细胞学确诊,可评价疗效。其中男性21例,女性9例;年龄36~70岁,中位年龄47岁;鳞癌13例,腺癌16例,腺鳞癌1例。所有患者Karnofsky评分大于70分,预计生存期3个月以上,有可测量的影像学指标,近3个月未接受抗肿瘤治疗。治疗前血常规、肝肾功能、心电图基本正常,要求患者签署知情同意书。

1.2 治疗方案

GEM和DDP均为江苏豪森医药公司生产,GEM 1 000 mg/m^2,加入250 ml生理盐水中,治疗第1、8天静脉滴注30 min;DDP 30 mg/m^2,第1~3天静脉滴注;同时给予静脉补液,每日不停于2 000 ml。21 d为1个周期,至少化疗2个周期后评定疗效。

作者简介:王 言,男,湖北省襄樊市人,主治医师,主要从事恶性肿瘤化放疗方面的研究。电话:(0710)3912621,E-mail:wangyan0666@126.com

收稿日期:2008-04-21;修回日期:2008-08-19

1.3 评价标准

近期疗效按WHO实体瘤疗效评定标准,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定(SD)、进展(PD),以CR+PR为有效。药物毒性反应按WHO抗癌药物急性与亚急性毒性反应分度标准分为0~Ⅳ度。

2 结果

2.1 疗效

患者均完成治疗,可评价疗效。30例中,CR 2例,PR 14例,SD 7例,PD 7例,有效率为53.3%。

2.2 毒副反应

毒性反应以骨髓抑制、消化道反应最常见。Ⅲ~Ⅳ度白细胞减少发生率为30.0%,Ⅲ~Ⅳ度血小板减少发生率为10.0%(表1)。

表1 患者毒副反应发生情况(例)

毒副反应	0度	Ⅰ度	Ⅱ度	Ⅲ度	Ⅳ度
白细胞减少	3	6	12	7	2
贫血	14	8	7	1	0
血小板减少	19	5	3	3	0
恶心呕吐	8	11	6	5	0
腹泻	26	2	2	0	0
肝功能异常	25	3	2	0	0
肾功能异常	25	2	3	0	0
脱发	24	3	3	0	0
发热	27	2	1	0	0

(下转591页)